

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-142221

(P2017-142221A)

(43) 公開日 平成29年8月17日(2017.8.17)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 A	2 G 0 4 5
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	4 B 0 5 0
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	C 1 2 N 9/12	
C 1 2 N 9/66 (2006.01)	C 1 2 N 9/66	
C 1 2 N 9/64 (2006.01)	C 1 2 N 9/64 Z	
審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 13 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-83342 (P2016-83342)
 (22) 出願日 平成28年4月19日 (2016.4.19)
 (31) 優先権主張番号 特願2016-21753 (P2016-21753)
 (32) 優先日 平成28年2月8日 (2016.2.8)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000002288
 三洋化成工業株式会社
 京都府京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の
 1
 (72) 発明者 宮森 将光
 京都市東山区一橋野本町 1 1 番地の 1 三
 洋化成工業株式会社内
 Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB31 DA20
 4B050 CC07 DD11 HH04 JJ10 KK02
 KK08 LL03

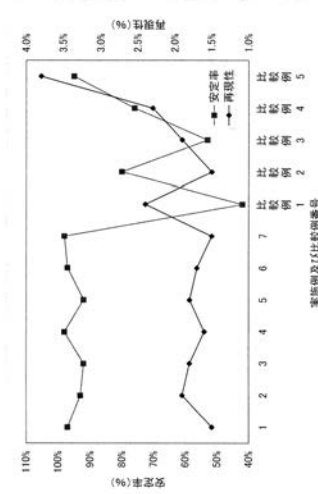
(54) 【発明の名称】 酵素含有凍結水溶液

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】本発明の目的は、体外診断用検査薬のバイオマーカーに用いられる酵素抗原を含有する水溶液を安定的に凍結させることが出来る水溶液を提供することにある。

【解決手段】体外診断用検査薬のバイオマーカー(クレアチンホスホキナーゼ-MBアイソザイム、神経特異エノラーゼ及びレニンなど)の較正物質として用いられる酵素抗原を含有する水溶液に、糖類、好ましくは二糖類と塩化マグネシウムを含有させ、pHを5.0~9.0の間で調整することにより、凍結時の安定性及び長期間凍結安定性を維持させる。糖類は、スクロース及びラクトースが好ましい。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

酵素（A 0）、糖類（C）及び塩化マグネシウムを含有し、かつ pH が 5.0 ～ 9.0 である凍結された酵素含有水溶液（B）。

【請求項 2】

糖類（C）が、二糖類（C 1）である請求項 1 に記載の酵素含有水溶液（B）。

【請求項 3】

二糖類（C 1）が、スクロース及び / 又はラクトースである請求項 2 に記載の酵素含有水溶液（B）。

【請求項 4】

糖類（C）の含有量が、凍結された酵素含有水溶液（B）の重量に対して 3 ～ 25 重量 % である請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の酵素含有水溶液（B）。

【請求項 5】

塩化マグネシウムの含有量が、凍結された酵素含有水溶液（B）の重量に対して 0.02 ～ 2.0 重量 % である請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の酵素含有水溶液（B）。

【請求項 6】

酵素（A 0）が酵素抗原（A）であって、体外診断用検査薬（D）に用いられる請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の酵素含有水溶液（B）。

【請求項 7】

酵素抗原（A）が、クレアチンホスホキナーゼ - MB アイソザイム、マトリックスメタロプロティナーゼ - 3、エラスターゼ 1、レニン及び神経特異エノラーゼからなる群より選ばれる少なくとも 1 種のタンパクである請求項 6 に記載の酵素含有水溶液（B）。

【請求項 8】

請求項 6 又は 7 に記載の凍結された酵素含有水溶液を校正物質として測定することを特徴とする免疫測定方法。

【請求項 9】

酵素（A 0）を、糖類（C）及び塩化マグネシウムを含有し、かつ pH が 5.0 ～ 9.0 である凍結された水溶液（E）中で保存する、酵素（A 0）の保存方法。

【請求項 10】

- 40 以下で保存する、請求項 9 に記載の保存方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は体外診断用検査薬のバイオマーカーに用いられる酵素抗原を凍結保存する際に、凍結時の安定性及び長期間凍結安定性を維持させるための酵素含有水溶液に関する。

【背景技術】**【0002】**

免疫測定は、高い特異性及び感度のために医療診断目的で血清又は尿試料中のタンパク質を検出するのにしばしば使用される。そのような免疫測定には、測定試薬のほかに、患者の試料を定量化するための参照標準として使用される校正物質が必要である。通常この校正物質中に含まれる抗原は希薄であるため、抗原種によっては溶液中で著しく失活する場合がある。特にホルモンや酵素、不溶性タンパク質等の抗原溶液は失活が激しく、水溶液状の校正物質として用いるには困難な場合が多い。このような場合には、凍結乾燥等の方法で水分を除去した形態で保存し、使用時に水を加えて溶解する方法や、牛血清アルブミンや動物血清等のタンパク質を添加して水溶液を凍結し、安定性を確保する方法、さらに 50 % グリセロール存在下 - 20 で液状保管して凍結変性を防ぐ方法がとられてきた（例えば、非特許文献 1 及び 2 参照）。

しかしながら、凍結乾燥により乾燥した試料は、使用前に緩衝液などで必要な濃度に溶解させる必要があり、溶解させる液量などの誤差により校正物質の濃度への誤差が生じ、

10

20

30

40

50

患者の試料の定量化の正確性に影響を与える問題があった。また、クレアチンホスホキナーゼ - M Bアイソザイムや神経特異エノラーゼのような酵素抗原は、従来の方法では凍結時の安定性を確保することが困難であるという問題があった。また、50%グリセロール存在下 - 20 で液状保管する方法では、粘度が高くサンプリング精度が低いため校正物質としてそのまま免疫測定に用いることができない問題点があった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】佐々木 實、免疫化学的同定法（第3版）、東京化学同人、1993年

【非特許文献2】水岡 慶二、免疫血清検査マニュアル、講談社サイエンティフィク、1986年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、体外診断用検査薬のバイオマーカーに用いられる酵素抗原を含有する水溶液を安定的に凍結させることが出来る水溶液を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、上記目的を達成するため鋭意検討した結果、本発明に到達した。即ち本発明は、酵素（A0）、糖類（C）及び塩化マグネシウムを含有し、かつpHが5.0～9.0である凍結された酵素含有水溶液（B）；凍結された該酵素含有水溶液を校正物質として測定することを特徴とする免疫測定方法；該酵素（A0）の保存方法 である。

【発明の効果】

【0006】

本発明の凍結された酵素含有水溶液により、活性が低下しやすい酵素抗原、特にCK-MB又はNSEなどの体外診断薬の診断マーカーに用いられる酵素抗原の凍結時の保存安定性が向上し、長期間その活性を持続させることができる。また、使用前に所定濃度の溶解させる操作がないため、校正物質の濃度誤差がなくなり、患者の試料の定量化の正確性を担保できる。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】凍結された酵素含有水溶液の安定性と再現性

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明における酵素（A0）は、通常この分野で用いられる酵素であれば、特に限定はないが、国際生化学連合の酵素委員会によって6つに分類された酵素が挙げられる。酸化還元酵素としては、ペルオキシダーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、りんご酸デヒドロゲナーゼ及びスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）などが挙げられる。転移酵素としては、トランスアミナーゼ、リン酸転移酵素、 γ -GTP及びプロテインキナーゼなどが挙げられる。加水分解酵素としてはアミラーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、キモトリプシン、トリプシン及びアデノシン三リン酸加水分解酵素などが挙げられ、脱離酵素としては、脱炭酸酵素及びアルドラーゼなどが挙げられる。異性化酵素としてはラセマーゼなどが挙げられる。合成酵素としてはリガーゼ、クエン酸合成酵素及びデキストリン合成酵素などが挙げられる。

酵素（A0）を含有する本発明の凍結された酵素含有水溶液（B）は酵素保存液等として使用することが出来る。

【0009】

本発明における酵素抗原（A）は、上記酵素（A0）の中で体外診断用検査薬に用いられるバイオマーカーに用いられる酵素抗原であれば、特に限定されないが、例えばクレアチンホスホキナーゼ - M Bアイソザイム（CK-MB）、癌関連ガラクトース転移酵素（

10

20

30

40

50

GAT)、5'-NPD-V、腓分泌性トリプシンインヒビター(PSTI)、前立腺酸性フォスファターゼ(PAP)、マトリックスメタロプロティナーゼ-3(MMP-3)、エラスターゼ1、神経特異エノラーゼ(NSE)、アルカリ性ホスファターゼ、アミラーゼ、酸性ホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ -GTP)、リパーゼ、乳酸脱水素酵素(LDH)、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、レニン、プロテインキナーゼ(PK)、チロシンキナーゼ等の酵素が挙げられる。免疫測定法で測定が可能なCK-MB、MMP-3、エラスターゼ1、レニン及びNSEが好ましく、凍結による酵素の保存安定性が悪く本発明による効果が高いことからCK-MB及びNSEがさらに好ましい。

10

【0010】

本発明の凍結された酵素含有水溶液(B)のpHは、5.0~9.0である。pHが5.0未満またはpHが9.0を超える場合は、酵素抗原の最適pHを外れ保存安定性が悪くなる。

【0011】

本発明における凍結された酵素含有水溶液(B)に含有する酵素抗原(A)は1種類を単独に用いても2種類以上を併用することも出来る。

【0012】

本発明における糖類(C)としては、単糖類及び二糖類等が挙げられる。単糖類としてはグルコース、ガラクトース、マンノース及びフルクトースが好ましく、二糖類としてはラクトース、スクロース、及びマルトースが好ましい。その中でも、凍結時の酵素の安定性の観点から、二糖類が好ましく、特にスクロース及び/又はラクトースが好ましい。

20

【0013】

本発明における凍結された酵素含有水溶液(B)に含有させる糖類(C)は、1種類を単独で用いても2種以上を併用してもよい。

【0014】

本発明における凍結された酵素含有水溶液(B)に含有させる糖類(C)の含有量として、酵素含有水溶液(B)(25)の重量に対して、好ましくは3~25重量%、更に好ましくは4~20重量%、特に好ましくは5~15重量%である。3重量%以上では凍結時に酵素を安定させる効果があり、25重量%以下であると水溶液の液粘度が高くなく、体外診断用検査薬で測定する際に、サンプリング精度が低下することがない。

30

【0015】

本発明における塩化マグネシウムの含有量として、酵素含有水溶液(B)(25)の重量に対して、好ましくは0.02~2.0重量%、更に好ましくは0.05~1.0重量%、特に好ましくは0.1~0.5重量%である。0.02重量%以上では凍結時に酵素を安定させる効果があり、2.0重量%以下であると体外診断用検査薬で測定する際に、測定値への影響を及ぼさない。

【0016】

本発明における体外診断薬用検査薬(D)は、通常この分野で測定されるものであれば特に限定はされず、例えば化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、電気化学発光免疫測定法(ECLIA)、蛍光酵素免疫測定法(FEIA)、化学発光免疫測定法(CLIA)、ラッセックス光学免疫測定法(LPIA)及びラッセックス粒子計数免疫凝集測定法(CIA)に用いられる検査薬が挙げられる。

40

これらの測定法において、本発明の酵素抗原(A)を含有する酵素含有水溶液(B)は、解凍して参照標準として使用される校正物質として使用されることが好ましい。

【0017】

さらに該体外診断薬用検査薬(D)が化学発光酵素免疫測定法に用いられる検査薬の場合、固相担体としては、通常この分野で測定されるものであれば特に限定はされず、例えばガラスビーズ、ポリスチレンビーズ、磁性シリカ粒子、マイクロプレート、ラッセックス等

50

が代表的なものとして挙げられる。具体的には、例えば特開 2 0 1 4 - 2 1 0 6 8 0 号公報及び特開 2 0 1 3 - 0 1 9 8 8 9 号公報等に記載の公知の磁性シリカ粒子が好ましい。

【 0 0 1 8 】

該体外診断薬用検査薬 (D) における磁性シリカ粒子は、シリカのマトリックス中に平均粒子径が 1 ~ 1 5 n m で超常磁性を有する金属酸化物を分散されているものである。超常磁性とは、外部磁場の存在下で物質の個々の原子磁気モーメントが整列し誘発された一時的な磁場を示し、外部磁場を取り除くと、部分的な整列が損なわれ磁場を示さなくなることという。

【 0 0 1 9 】

平均粒子径が 1 ~ 1 5 n m で超常磁性を示す超常磁性金属酸化物としては、鉄、コバルト、ニッケル及びこれらの合金等の酸化物が挙げられるが、磁界に対する感応性が優れていることから、酸化鉄が特に好ましい。超常磁性金属酸化物は、1 種を単独で用いても 2 種以上を併用してもよい。

10

【 0 0 2 0 】

磁性シリカ粒子中の超常磁性金属酸化物の含有量の下限は、通常 6 0 重量 %、好ましくは 6 5 重量 % であり、上限は通常 9 5 重量 %、好ましくは 8 0 重量 % である。超常磁性金属酸化物の含有量が 6 0 重量 % 未満の場合、得られた磁性シリカ粒子の磁性が十分でないため、実際の用途面における分離操作に時間がかかり、9 5 重量 % を超えるものは合成が困難である。

【 0 0 2 1 】

凍結された酵素含有水溶液 (B) の保存方法としては、通常この分野で用いられる方法であれば、特に限定はないが、凍結温度としてはタンパク質分解酵素の作用が停止する - 4 0 以下が好ましく、保存機器として一般的に購入可能な超低温フリーザーの庫内温度制御範囲である - 5 0 以下がさらに好ましい。凍結容器としては、- 4 0 以下の温度でも耐久性のある保管容器であれば、特に限定はないが、例えばクライオチューブ (サーモフィッシャーサイエンティフィック (株) 製)、遠沈管 (コーニングインターナショナル (株) 製)、マイクロチューブ (エッペンドルフ (株) 製)、スクリュー管 ((株) マルエム製)、PCR チューブ (日本ジェネティクス (株) 製) が挙げられる。凍結期間としては、特に限定はないが、酵素安定性の観点から 2 年以内が好ましい。

20

凍結された酵素含有水溶液 (B) の解凍方法としては、通常この分野で解凍する方法であれば、特に限定はないが、酵素安定性の観点から、氷水または流水で素早く解凍する方法が好ましい。

30

【実施例】

【 0 0 2 2 】

以下、実施例により、本発明を更に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【 0 0 2 3 】

実施例 1

酵素含有水溶液の作製

0 . 1 重量 % の牛血清アルブミン、0 . 8 5 重量 % の塩化ナトリウム (和光純薬工業 (株) 製)、0 . 5 重量 % の塩化マグネシウム (和光純薬工業 (株) 製) 及び 1 0 重量 % のスクロース (和光純薬工業 (株) 製) を含有させた 0 . 0 2 M リン酸緩衝液 (p H 7 . 0) を調製し、その後 N S E (H Y T E S T 社製) を 1 0 n g / m L となるように添加、攪拌して水溶液を得た。さらに、得られた水溶液を 1 . 5 m L クライオチューブ (サーモフィッシャーサイエンティフィック (株) 製) に 1 m L 移し変えて、超低温フリーザー (型番 : M D F - U 7 0 0 V X S 6 - P J パナソニックヘルスケアホールディングス (株) 製) をもちいて、- 8 0 で凍結して 1 年間保管し酵素含有水溶液 (B 1) を得た。また、同操作を繰り返し、酵素含有水溶液 (B 1) を 1 0 サンプル得た。

40

【 0 0 2 4 】

磁性シリカ粒子を含有する固相担体試薬の作製 :

50

1 重量% γ -アミノプロピルトリエトキシシラン含有水溶液 40 mL の入った蓋付きポリスチレン瓶に製造した磁性シリカ粒子（商品名：マグラピッド、三洋化成工業（株）製）40 mg を加え、25℃ で 1 時間反応させ、ネオジウム磁石で磁性シリカ粒子を集磁後、液をアスピレーターで吸引除去した。次いで脱イオン水 40 mL を加えて蓋をし、ポリスチレン瓶をゆっくりと 2 回倒置攪拌した後、ネオジウム磁石で磁性シリカ粒子を集磁後、液をアスピレーターで吸引除去して磁性シリカ粒子を洗浄した。この洗浄操作を 5 回行った。次いで、この洗浄後の磁性シリカ粒子を 2 重量% グルタルアルデヒド含有水溶液 40 mL の入った蓋付きポリスチレン瓶に加え、25℃ で 1 時間反応させた。そして、脱イオン水 40 mL を加えて蓋をし、ポリスチレン瓶をゆっくりと 2 回倒置攪拌したのち、ネオジウム磁石で磁性シリカ粒子を集磁後、液をアスピレーターで吸引除去して磁性シリカ粒子を洗浄した。この洗浄操作を 10 回行った。更にこの洗浄後の磁性シリカ粒子を抗NSEモノクローナル抗体（Medix社製）10 μ g/mL の濃度で含む 0.02 M リン酸緩衝液（pH 8.7）120 mL の入った蓋付きポリスチレン瓶に加え、25℃ で 1 時間反応させた。反応後、ネオジウム磁石で磁性シリカ粒子を集磁後、抗NSEモノクローナル抗体含有リン酸緩衝液を除去した。次いで、磁性シリカ粒子を 1 重量% の牛血清アルブミン含有の 0.02 M リン酸緩衝液（pH 7.0）40 mL の入った蓋付きポリエチレン瓶に加え、25℃ で 12 時間浸漬させたのち、ネオジウム磁石でシリカ粒子を集磁後、1 重量% の牛血清アルブミン含有のリン酸緩衝液を除去した。抗NSE抗体結合磁性シリカ粒子濃度として 0.5 mg/mL の濃度に希釈し、磁性シリカ粒子を含有する試薬を調製し、冷蔵（2～10℃）で保存した。

10

20

【0025】

標識試薬の作製：

抗NSEモノクローナル抗体（Medix社製）、西洋ワサビ由来POD（東洋紡製）を用い、文献（エス・ヨシタケ、エム・イマガワ、イー・イシカワ、エトール；ジェイ・バイオケム，Vol. 92，1982，1413-1424）に記載の方法でPOD標識抗NSE抗体を調製した。これを 0.5 重量% の牛血清アルブミン含有の 0.02 M リン酸緩衝液（pH 7.0）で、POD標識抗NSE体濃度として 20 nM の濃度に希釈し、標識試薬を調製し、冷蔵（2～10℃）で保存した。

【0026】

化学発光試薬第1液の調製：

ルミノールのナトリウム塩〔シグマ アルドリッチ ジャパン（株）製〕0.7 g 及び 4-（シアノメチルチオ）フェノール 0.1 g を 1,000 mL メスフラスコに仕込んだ。3-〔4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニル〕プロパンスルホン酸/水酸化ナトリウム緩衝液（10 mM、pH 8.6）を溶液の容量が 1,000 mL になるように仕込み、25℃ で均一混合して化学発光試薬第1液を調製した。測定に用いるまで冷蔵（2～10℃）保存した。

30

【0027】

化学発光試薬第2液の調製：

1,000 mL 及び過酸化水素〔和光純薬工業（株）製、試薬特級、濃度 30 重量%〕6.6 g を 1,000 mL メスフラスコに仕込んだ。脱イオン水を溶液の容量が 1,000 mL になるように仕込み、25℃ で均一混合して化学発光試薬第2液を調製した。測定に用いるまで冷蔵（2～10℃）保存した。

40

【0028】

実施例 2

酵素含有水溶液の作製における 10 重量% のスクロースを 20 重量% に変更し、0.02 M リン酸緩衝液（pH 7.0）を 0.02 M リン酸緩衝液（pH 5.0）に変更した以外は、実施例 1 と同様にして酵素含有水溶液（B2）を得た。

【0029】

実施例 3

酵素含有水溶液の作製における 0.5 重量% の塩化マグネシウムを 0.02 重量% に変更

50

し、0.02 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) を0.02 Mリン酸緩衝液 (pH 9.0) に変更した以外は、実施例1と同様にして酵素含有水溶液 (B3) を得た。

【0030】

実施例4

酵素含有水溶液の作製における0.5重量%の塩化マグネシウムを2.0重量%に変更した以外は、実施例1と同様にして酵素含有水溶液 (B4) を得た。

【0031】

実施例5

酵素含有水溶液の作製における10重量%のスクロースを3重量%のスクロース (和光純薬工業 (株) 製) に変更した以外は、実施例1と同様にして酵素含有水溶液 (B5) を得た。

10

【0032】

実施例6

酵素含有水溶液の作製における10重量%のスクロースを25重量%のラクトース (和光純薬工業 (株) 製) に変更した以外は、実施例1と同様にして酵素含有水溶液 (B6) を得た。

【0033】

実施例7

酵素含有水溶液の作製におけるNSEを10 ng/mLとなるように添加をCK-MBを10 ng/mLに変更した以外は、実施例1と同様にして酵素含有水溶液 (B7) を得た。

20

また、磁性シリカ粒子を含有する固相担体試薬の作製において、抗NSEモノクローナル抗体を抗CK-MBモノクローナル抗体に変更した以外は、実施例1と同様に磁性シリカ粒子を含有する固相担体試薬を得た。

さらに、標識試薬の作製において、抗NSEモノクローナル抗体を抗CK-MBモノクローナル抗体 (Medix社製) に変更した以外は、実施例1と同様に標識試薬を得た。

【0034】

比較例1

酵素含有水溶液の作製における10重量%のスクロースからスクロースを抜いた以外は、実施例1と同様にして酵素含有水溶液 (H1) を得た。

30

【0035】

比較例2

酵素含有水溶液の作製における0.5重量%の塩化マグネシウムから塩化マグネシウムを抜いた以外は、実施例1と同様にして酵素含有水溶液 (H2) を得た。

【0036】

比較例3

酵素含有水溶液の作製における0.02 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) を0.02 Mリン酸緩衝液 (pH 10.0) に変更した以外は、実施例1と同様にして酵素含有水溶液 (H3) を得た。

40

【0037】

比較例4

酵素含有水溶液作製における超低温フリーザーをもちいて、-80℃で凍結して1年間保管を、冷蔵庫を用いて4℃で1年間保管に変更する以外は、実施例1と同様にして酵素含有水溶液 (H4) を得た。

【0038】

比較例5

酵素含有水溶液作製における水溶液を凍結乾燥用5 mLバイアル瓶 (EYELA東京理化工業 (株) 製) に2 mL移し変え、凍結乾燥機を用いて凍結乾燥を行いゴム栓及びアルミキャップして1年間4℃保管し、酵素含有凍結乾燥サンプル (H5) を得た。

50

【0039】

得られた試薬（Ｂ１）～（Ｂ６）、及び（Ｈ１）～（Ｈ４）を用いて、以下の方法により免疫測定における酵素の凍結安定性を評価した。凍結安定性の結果を表１、図１に示す。

【 ０ ０ ４ ０ 】

【表 1】

実施例番号	1	2	3	4	5	6	7		1	2	3	4	5
比較例番号									1	2	3	4	5
酵素抗原(A)	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE	NSE	CK-MB		NSE	NSE	NSE	NSE	NSE
糖類(C) (wt%)	10	20	10	10	3		10			10	10	10	10
ラクトース						25							
塩化マグネシウム (wt%)	0.50	0.50	0.02	2.0	0.50	0.50	0.50		0.50		0.50	0.50	0.50
pH	7.0	5.0	9.0	7.0	7.0	7.0	7.0		7.0	7.0	10.0	7.0	7.0
保存方法	凍結 (-80°C)	凍結 (-80°C)	凍結 (-80°C)	凍結 (-80°C)	凍結 (-80°C)	凍結 (-80°C)	凍結 (-80°C)		凍結 (-80°C)	凍結 (-80°C)	凍結 (-80°C)	冷蔵 (4°C)	凍結乾燥 (4°C)
安定率	97%	93%	92%	98%	92%	97%	98%		42%	80%	53%	76%	95%
再現性	1.5%	1.9%	1.8%	1.6%	1.8%	1.7%	1.5%		2.4%	1.5%	1.9%	2.3%	3.8%

< 本発明の酵素含有水溶液の酵素凍結安定性評価方法 >

(1) 実施例 1 ~ 6 で得られた凍結された酵素含有水溶液 (B 1) ~ (B 6) 、比較例 1 ~ 4 で得られた比較酵素含有水溶液 (H 1) ~ (H 4)

凍結された酵素含有水溶液 (B) を氷水中で解凍し、転倒攪拌にて混合して水溶液を得た。ただし、比較例 4 ではこの操作は不要である。

得られた水溶液 0 . 0 2 5 m L と磁性シリカ粒子を含有する試薬 0 . 0 2 5 m L を試験管に入れて混合し、試験管中で 3 7 3 分間反応させ、抗 N S E 抗体結合磁性シリカ粒子 / N S E 複合体を形成させた。反応後、試験管の外側からネオジウム磁石で磁性シリカ粒子を 1 0 秒間集め、試験管中の液をアスピレーターで除き、ネオジウム磁石を側面から十分に離し、生理食塩水 0 . 5 m L を加えて磁性シリカ粒子を分散させて集磁後、アスピレーターで液を除く洗浄操作を 3 回行った。

10

【 0 0 4 2 】

続いて、0 . 5 重量 % の牛血清アルブミン含有した標識試薬 0 . 0 2 5 m L を試験管に注入し、試験管中で 3 7 3 分間反応させ、抗 N S E 抗体結合磁性シリカ粒子 / N S E / P O D 標識抗 N S E 抗体複合体を形成させた。反応後、試験管の外側からネオジウム磁石で磁性シリカ粒子を 1 0 秒間集め、試験管中の液をアスピレーターで除き、ネオジウム磁石を側面から十分に離し、生理食塩水 0 . 5 m L を加えて磁性シリカ粒子を分散させて集磁後、アスピレーターで液を除く洗浄操作を 2 回行った。

最後に、化学発光試薬第 1 液 0 . 0 7 m L と化学発光試薬第 2 液 0 . 0 7 m L とを同時に加え、3 7 で 4 3 秒間発光反応させ、化学発光試薬を添加後 4 3 ~ 4 5 秒の平均発光量をルミノメーター [ベルトールドジャパン社製「 L u m a t L B 9 5 0 7 」] で測定した。

20

【 0 0 4 3 】

(2) 実施例 7 で得られた凍結された酵素含有水溶液 (B 7)

【 0 0 4 4 】

酵素含有水溶液 (B 7) 0 . 0 2 5 m L と磁性シリカ粒子を含有する試薬 0 . 0 2 5 m L を試験管に入れて混合し、試験管中で 3 7 3 分間反応させ、抗 C K - M B 抗体結合磁性シリカ粒子 / C K - M B 複合体を形成させた。反応後、試験管の外側からネオジウム磁石で磁性シリカ粒子を 1 0 秒間集め、試験管中の液をアスピレーターで除き、ネオジウム磁石を側面から十分に離し、生理食塩水 0 . 5 m L を加えて磁性シリカ粒子を分散させて集磁後、アスピレーターで液を除く洗浄操作を 3 回行った。

30

【 0 0 4 5 】

続いて、0 . 5 重量 % の牛血清アルブミン含有した標識試薬 0 . 0 2 5 m L を試験管に注入し、試験管中で 3 7 3 分間反応させ、抗 C K - M B 抗体結合磁性シリカ粒子 / C K - M B / P O D 標識抗 C K - M B 抗体複合体を形成させた。反応後、試験管の外側からネオジウム磁石で磁性シリカ粒子を 1 0 秒間集め、試験管中の液をアスピレーターで除き、ネオジウム磁石を側面から十分に離し、生理食塩水 0 . 5 m L を加えて磁性シリカ粒子を分散させて集磁後、アスピレーターで液を除く洗浄操作を 2 回行った。

最後に、化学発光試薬第 1 液 0 . 0 7 m L と化学発光試薬第 2 液 0 . 0 7 m L とを同時に加え、3 7 で 4 3 秒間発光反応させ、化学発光試薬を添加後 4 3 ~ 4 5 秒の平均発光量をルミノメーター [ベルトールドジャパン社製「 L u m a t L B 9 5 0 7 」] で測定した。

40

【 0 0 4 6 】

(3) 比較例 5 で得られた比較酵素含有水溶液 (H 5)

酵素含有凍結乾燥サンプル (H 7) のアルミキャップ及びゴム栓を外し、イオン交換水 2 m L をバイアル瓶に加えて、室温で 1 5 分静置保管し、その後転倒攪拌を 1 0 回繰り返して水溶液とした。得られた水溶液は酵素含有水溶液 (B 1) と同様に測定した。

安定性の結果を表 1 、図 1 に示す。

【 0 0 4 7 】

安定性については、N S E 及び C K - M B の標準品を用いて免疫測定を行い、得られた測

50

定結果を検量線として、濃度値を算出した。得られた濃度値（ X_1 ）と理論値（ X_2 ）から以下の計算式で安定率を算出した。濃度値（ X_1 ）は実際に測定によって算出された濃度値を示し、理論値（ X_2 ）は酵素含有水溶液を作製したときのNSE及びCK-MBそれぞれの濃度を示す。具体的にはNSEの場合は 10 ng/mL 、CK-MBの場合は 10 ng/mL を示す。

$$\text{安定率}(\%) = (X_1 / X_2) \times 100$$

【0048】

<本発明の酵素含有水溶液の再現性評価方法>

得られた試薬（ B_1 ）～（ B_7 ）、及び（ H_1 ）～（ H_5 ）を用いて、以下の方法により免疫測定における酵素含有水溶液の再現性を評価した。再現性の結果を表1、図1に示す。

酵素含有水溶液作製における酵素含有水溶液10サンプルを酵素凍結安定性評価方法と同じ方法で免疫測定を行い、10サンプルの平均濃度値（ X_3 ）と標準偏差（ X_4 ）から以下の計算式で変動係数（ CV ）を算出した。

$$CV(\%) = (X_4 / X_3) \times 100$$

【0049】

表1及び図1より本発明の酵素含有水溶液は、比較用の酵素含有水溶液を用いた場合に比べて、安定率が90%以上を示し、本発明の酵素含有水溶液は凍結時の安定性が向上していることを示す。

また、本発明の酵素含有水溶液は、比較用の酵素含有水溶液を用いた場合に比べて、 CV が3.0%以下を示し、再現性が優れていることから、本発明の酵素含有水溶液を用いた測定における正確性が向上していることを示す。

【産業上の利用可能性】

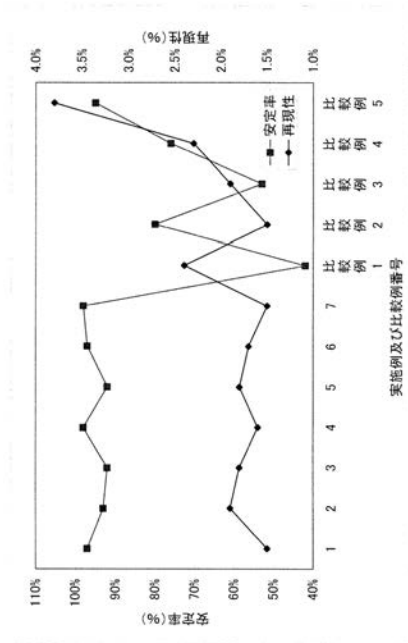
【0050】

本発明の酵素含有水溶液は、酵素抗原の凍結時の安定性が優れ、測定値の正確性及び操作簡便性が向上できることから、放射免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法及び化学発光免疫測定法等の臨床検査の校正物質や、酵素の凍結保管水溶液として幅広く適用できる。また、長期にわたり酵素を安定的に凍結保管することかできる。

10

20

【図 1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.

C 1 2 N 9/88 (2006.01)

F I

C 1 2 N 9/88

テーマコード (参考)

专利名称(译)	酵素含有冻结水溶液		
公开(公告)号	JP2017142221A	公开(公告)日	2017-08-17
申请号	JP2016083342	申请日	2016-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	三洋化成工业株式会社		
[标]发明人	宫森将光		
发明人	宫森 将光		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 C12N9/12 C12N9/66 C12N9/64 C12N9/88		
FI分类号	G01N33/531.A G01N33/68 C12N9/12 C12N9/66 C12N9/64.Z C12N9/88		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB31 2G045/DA20 4B050/CC07 4B050/DD11 4B050/HH04 4B050/JJ10 4B050/KK02 4B050/KK08 4B050/LL03		
优先权	2016021753 2016-02-08 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明要解决的问题本发明的目的是提供一种能够稳定地冷冻含有酶抗原的水溶液的水溶液，该酶抗原用作体外诊断用诊断试剂的生物标记物。溶液：在含有酶抗原的水溶液中，用作体外诊断试验药物的生物标记物（肌酸磷酸激酶-MB同工酶，神经特异性烯醇化酶，肾素等）的校准物，糖类，优选二糖和氯化镁并且将pH调节在5.0和9.0之间以保持冷冻时的稳定性和长期冷冻稳定性。糖优选为蔗糖和乳糖。点域1

